

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25450024

研究課題名(和文)ダイズ子実肥大期の窒素同化能力の強化による収量増加のアプローチ

研究課題名(英文)Yield performance by nitrogen manipulation during seed filling in soybean

研究代表者

鄭紹輝(Zheng, Shao-Hui)

佐賀大学・農学部・教授

研究者番号：90253517

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ダイズでは子実登熟期に土壌よりの窒素供給不足を補うため、葉などの栄養器官に貯蓄された窒素を子実に再転流させることが知られている。本研究では、その栄養器官からの窒素流出時期は子実成長が最も激しい子実登熟中期(R6)であること、及びこの時期の土壌窒素を増減することによってこの窒素転流を制御でき、しいては葉の老化を制御できることを明らかにした。さらに葉からの窒素転流にはオートファジー関連遺伝子であるGmATG8cが密接に関わっていることが分かった。本研究の結果から、ダイズが成熟期に一斉に落葉する「一斉登熟性」は登熟期の窒素供給バランスにより制御されていることが実証された。

研究成果の概要(英文)：It is known that accumulated nitrogen in vegetative organs is remobilized to the seed during seed filling to compensate for the short of nitrogen supply from root system in soybean. This research revealed that this nitrogen remobilization occurred at the mid of seed filling (R6), and this remobilization relating with leaf senescence could be hastened or delayed by manipulating soil nitrogen supply. Furthermore, it is also found that the expression of GmATG8c, an autophagy relating gene was synchronized with this nitrogen remobilization. These results suggest that monocarpic senescence in soybean could be controlled by the balance of nitrogen demand and supply during seed filling.

研究分野：農学

キーワード：ダイズ 子実収量 窒素転流 老化 一斉登熟性

## 1. 研究開始当初の背景

ダイズの子実には約 40%のタンパク質を含んでいるため、子実肥大期間中には大量の窒素を子実に供給する必要がある。しかし、ダイズは根粒菌との共生により窒素供給源が豊富にあるため、ダイズ栽培においては窒素の少量施肥、あるいは無施肥でも子実収量にはさほど影響がないと考えられている。ところで、子実への窒素供給源は主に二つある。子実肥大期に根系から直接供給される窒素（根粒による固定分を含む）もう一つはこれまで栄養器官に蓄積された窒素の子実への再転流である。これまでの研究によれば、ダイズ植物は子実肥大開始前までに同化した窒素を葉などの栄養器官にいったん蓄積し、子実成長開始後莢に再転流させており、この窒素転流量が子実全窒素量の 4 から 5 割をも占めるほど子実収量には大変重要であることが示唆されている（Hanway and Weber, 1971; Shibles ら、1998 ; Shiraiwara, 1995）。一方、ダイズの子実肥大期間中も、根粒の窒素固定や、直接土壌からの窒素吸収が重要であるとの報告もある（Egli ら、2007）。

ダイズの窒素同化の最終目的は子実への分配である。根系から吸収された窒素は子実肥大開始期（栄養成長終了）までは、栄養器官に分配・蓄積されるが、子実肥大が開始すると子実の方へ送られる。しかし、子実肥大の進行に伴い子実の窒素要求量が急激に増大していき、根系からの供給だけでは足りなくなり、その不足分の補充として栄養器官（特に葉）から窒素が子実に再転流される（右図参照）。その結果、葉からの窒素流出により葉が一斉に老化していき、茎葉の枯死がみられる。Sinclair ら（1975）はこの現象を子実生産を確保するための「自己破壊」と説明している。しかし、この「自己破壊」の機構はどのように制御されているかは依然不明である。

申請者らはこれまで、ダイズ子実成長の同調性や、葉の老化と一斉登熟性の関係について追及してきた。ダイズの開花は花房次位によって早晩の違いはあるが、その違いは子実成長の段階では短縮されている。つまり、子実成長は開花の早晩とは関係なく一斉に起こる傾向がみられる（Zheng et al., 2004）。また、ダイズの葉の老化は、葉位（葉齢）に関係なくある時期に同調的に起こること、この時期は葉内可溶性タンパク質の低下と相前後に起こることも明らかにした（鍋田ら、2004）。これらの結果から推測すると、子実が一斉に成長することにより、ある時期から子実への窒素供給が根系のみでは不足になり、葉から能動的に窒素が取り出される結果、葉が一斉に老化していくと考えられる。実際に、申請者らは以前の研究で子実肥大期の窒素供給強化により葉の老化が遅れ、子実肥大期間の延長による増収効果が得られる兆候を観察し

ている（Zhao et al., 2014）。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、葉等の栄養器官からの窒素転流の時期の同定、並びにその時期に土壌よりの窒素供給条件を変えることによりダイズの葉の老化及び一斉登熟性にどのように影響するかを明らかにすることである。

## 3. 研究の方法

### 実験 1 ダイズ子実肥大期における窒素供給の実態評価

本研究の背景に述べたように、ダイズの子実成長への窒素供給源は、土壌（根粒を含む）からの直接吸収分と栄養器官からの転流分があると考えられる。本実験では、開花後定期的に各栄養器官のサンプリングにより蓄積窒素の動態、また、茎の地際切断面からの導管液の各種形態の窒素濃度分析により土壌からの供給窒素の実態を定量し、両窒素供給源の子実生産への貢献度を明らかにする。ダイズ品種フクユタカを圃場で慣行栽培し、開花期より 1 週間間隔でサンプリングを行い、器官ごとの乾物重および窒素濃度を測定し、器官ごとの窒素同化量を算出する。各期間内の同化窒素の増量を日数で割ることによって窒素同化速度を算出する。それによって、子実成長への窒素供給について、土壌からの供給分と栄養器官からの再転流による供給分を計算できる。

### 実験 2 子実肥大期間中の土壌の窒素供給能力の変化が栄養器官からの窒素転流並びに葉の老化に及ぼす影響

Sinclair ら（1975）によれば、ダイズ葉からの窒素転流は子実成長のための「自己破壊」であり、つまりその時点では土壌からの窒素供給が不足のため、栄養器官より窒素を引き出す戦略である。本実験は、栄養器官より窒素が流出する前後の時期に焦点を合わせ、土壌窒素を増減することにより、葉の老化をどのように影響するかを明らかにする。実験 1 同様にダイズ品種フクユタカを、土壌窒素濃度が制御しやすい細砂とパーミキュライトの混合培地を用いて栽培する。開花後定期的に葉のクロロフィル含量、窒素含量、可溶性タンパク質含量、光合成速度などの変化を測定し、葉の老化を評価する。

### 実験 3 ダイズ栄養器官から子実への窒素転流とオートファジー関連遺伝子発現との関係

オートファジーは、細胞内窒素栄養の再利用に密接に関わっているといわれている。近年の研究では、ダイズにおいて窒素飢餓状態に遭うとオートファジー関連遺伝子が発現し、古い器官より窒素栄養を分解して新しい器官に輸送するに役立っていると指摘されている。そこで本研究において葉などの栄養器官から子実への窒素転流にもオートファジーが関わっているのではないかと考え、実

験1, 2でサンプリングした各ステージの葉を用いて、オートファジー関連遺伝子の発現を解析する。

#### 4. 研究成果

##### 1) ダイズ子実肥大期における窒素需給の実態評価

圃場栽培のダイズにおいては、葉における全窒素及び可溶性タンパク質濃度は播種後60日目(子実肥大初期、R5)に最大になるが、同73日目(子実肥大中期、R6)からは減少に転じ、この減少は、栄養器官から窒素が子実へ再分配されたためであると考えられる(図1)。さらに、子実肥大期の窒素需要量がR6期に植物全体が取り込める窒素量を超えること、及びこれと同調的に葉のSPAD値

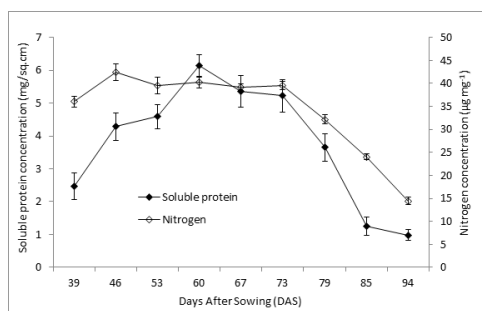


Fig. 1 Changes in Soluble protein and nitrogen concentrations in leaves of Fukuyutaka. Bars indicate the standard error of mean with six plants.

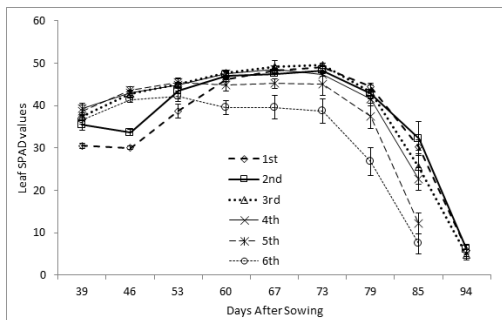


Fig.2 Leaf SPAD values in the reproductive growth stage of Fukuyutaka soybean grown in the field. The leaf position was counted from the top. Bars indicate the standard error of mean with six leaves.

(葉緑素含量)も葉齢に関係なく同調的に減少していき(図2) このR6期が葉からの窒素流出および老化開始のステージであることが示唆された。

##### 2) 子実肥大期間中の土壌の窒素供給能力の変化が栄養器官からの窒素転流並びに葉の老化に及ぼす影響

栄養器官からの窒素転流が始まると予想

されたR6期に、土壌中の窒素濃度を变化させたところ、低窒素処理区(5および25ppm)では葉のSPAD値、窒素および可溶性蛋白質含量は対照区(100ppm)に比べて急速に減少したが、高窒素処理区(200、400および800ppm)では、それらの値はほとんど低下せず、成熟期においても葉は緑色のままで、植物は枯死しなかった(図3)。このことは、子実肥大期に土壌よりの窒素供給が少ないと、栄養器官からの窒素が早く子実に転流されることを示している。

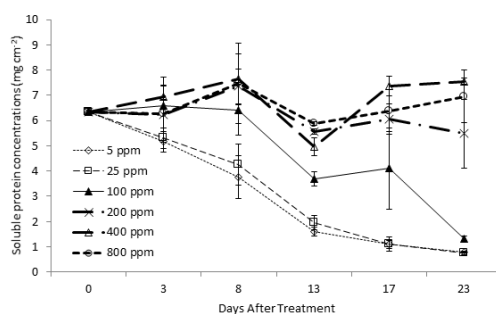
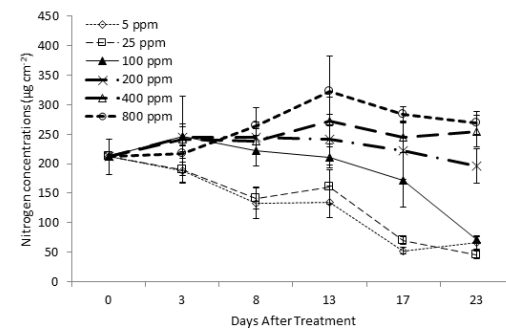
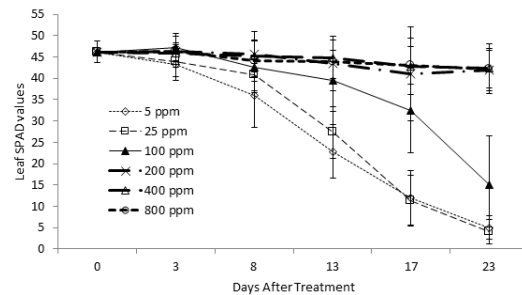


Fig. 3 Changes in leaf-SPAD values, nitrogen and soluble protein contents in Fukuyutaka with different nitrogen treatments during R6 to R7. Bars indicate standard deviations with four replications.

### 3) 栄養器官から子実への窒素転流とオートファジー関連遺伝子 *GmATG8c* の発現

細胞内窒素再利用機能を制御するオートファジー関連遺伝子 *GmATG8c* の発現は、葉からの窒素流出及び葉の SPAD 値の急激な低下に従って上昇し、葉細胞組織から窒素の転流が盛んに行われていることを示唆している(図4)。さらに、オートファジー遺伝子 *GmATG8c* の発現は、低窒素区では著しく増大したが、高窒素区では対照区と同程度かそれ以下であった(図5)。以上の結果から、ダイズでは子実肥大期において窒素に対する要求度が高く、土壌からの吸収で足りない場合は葉などの栄養器官から窒素を子実へ転流させ、その結果植物体が老化枯死することが示された。

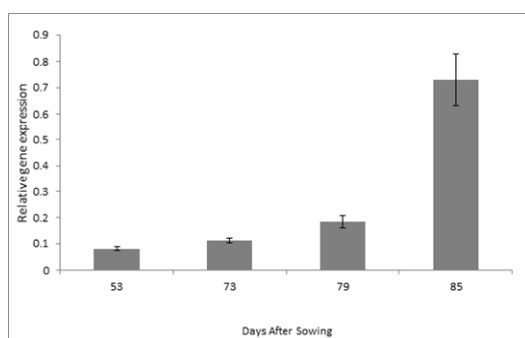


Fig. 4 Expression of *GmATG8c* in leaves with growth stages. Bars indicate the standard error of mean with 4 replications.

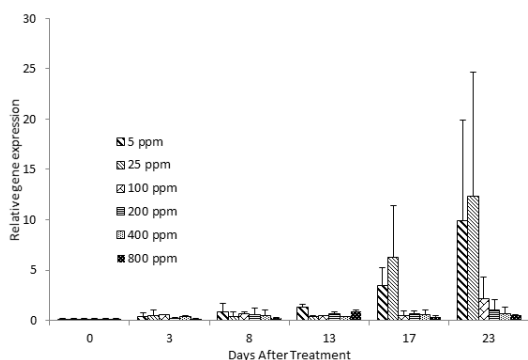


Fig. 5 Expression of *GmATG8c* in the leaves of Fukuyutaka treated with different concentrations of nitrogen during R6 to R7. Bars indicate the standard deviation with three replications.

以上の結果から、ダイズの一斉登熟性は子実肥大期における窒素の需要と供給のバランスによって左右されることが証明された。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に

は下線)

[雑誌論文](計2件)

1) Md. Matiul Islam, Yushi Ishibashi, Andressa C.S. Nakagawa, Yuki Tomita, Xin Zhao, Mari Iwaya-Inoue, Susumu Arima, Shao-Hui Zheng. Nitrogen manipulation affects leaf senescence during late seed filling in soybean. *Acta Physiologiae Plantarum* 39:42 (pp.1-9), 2017年1月

2) Md. Matiul Islam, Yushi Ishibashi, Andressa C.S. Nakagawa, Yuki Tomita, Mari Iwaya-Inoue, Susumu Arima, Shao-Hui Zheng. Nitrogen redistribution and its relationship with the expression of *GmATG8c* during seed filling in soybean. *Journal of Plant Physiology* 192: 71-74, 2016年3月

[学会発表](計1件)

1) Md. Matiul Islam and Shao-Hui Zheng. Effect of nitrogen supply on leaf nitrogen distribution, photosynthesis and senescence during seed filling in soybean. 8<sup>th</sup> Asian Crop Science Conference in Hanoi, Vietnam, 23-25 September, 2014.

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

[その他]  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鄭 紹輝 (Zheng, Shao-Hui) (佐賀大学・  
農学部・教授)

研究者番号：90253517

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：

(4) 研究協力者

( )